

Relazione sull'attività svolta per assegno di ricerca "Identification Of New Potentially Actionable Alterations In Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Next Generation Sequencing and Oncoscan Array"

Assegnista : **Dott.ssa Sandra Durante**

Tutor: **Dott. ssa Mariacristina Di Marco**

L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDA) è, ad oggi, la quarta causa di morte per patologia oncologica nel mondo occidentale, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni pari a circa il 5%. La forma precancerosa del PDA, Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN), si presenta come una patologia di sempre maggiore interesse, in virtù dell'incremento delle diagnosi incidentali legata ad un maggiore impiego dell' imaging addominale negli ultimi decenni, e ha una prevalenza di 99 casi su 100.000 abitanti nella popolazione con età superiore ai 60 anni. L'attività svolta durante il primo anno di dottorato ha avuto come obiettivo l'identificazione delle alterazioni genetiche ricorrenti nell'IPMN.

Sotto il profilo anatomico e istologico questo tipo di lesioni è stato ampiamente caratterizzato. Infatti morfologicamente le IPMN vengono suddivise in base alla comunicazione con il dotto principale o con i dotti periferici, mentre sulla base della differenziazione cellulare si riscontrano 4 istotipi (intestinale, gastrico, bilio-pancreatico ed oncocitico).

È noto che differenze in termini di morfologia e di anatomia patologica corrispondono ad una differente tendenza ad evolvere verso forme di crescite malignità e che a partire da diversi tipi istologici si sviluppano diverse forme di carcinoma, quali carcinoma colloide per l'istotipo intestinale, la forma oncocitica. Inoltre, recenti studi mostrano che differenti sottotipi istologici hanno solo una parziale sovrapposizione dello spettro mutazionale. In particolare è stato osservato che mutazioni di *GNAS* e *KRAS* sono presenti tipicamente nell'istotipo intestinale e gastrico e si ipotizza che possano essere eventi precoci nella carcinogenesi dell'IPMN; al contrario mutazioni di *TP53* sono state identificate solo nelle lesioni ad alto grado suggerendo come

questo tipo di mutazioni possano essere valutate come marker di displasia ad alto grado.

Alla luce di queste osservazioni l'obiettivo del lavoro è stato quello di analizzare casi di pazienti con IPMN allo scopo di individuare quali siano le alterazioni genetiche presenti fin da questo primo stadio della malattia. Sono stati selezionati in maniera retrospettiva 20 casi di IPMN con differenti stadi di displasia e differenti istotipi ed è stata verificata la presenza di alterazioni genetiche mediante Oncoscan Array. L'Oncoscan è un tipo di chip che permette di avere una *discovery* sulla presenza dei soli oncogeni e quindi un'analisi di *copy number*; inoltre permette di lavorare su campioni paraffinati, offrendo due grandi vantaggi: la possibilità di abbattere il grosso problema dalla scarsa cellularità dovuto principalmente alla natura del tessuto, di tipo fibroso grazie alla macrodissezione per selezionare l'area tumorale di interesse; la possibilità di studiare casistiche ampie, poiché è possibile utilizzare materiale biologico archiviato (campioni paraffinati). I dati generati sono stati analizzati con il programma Nexus che si basa su un algoritmo che permette di distinguere le cellule tumorali dalle cellule sane e fare l'analisi di *copy number* solo sulla quota di cellule malate. L'analisi con Oncoscan ha permesso di dividere la casistica in 2 categorie:

- 7 IPMN presentavano un cariotipo quasi normale, con nessuna o una alterazione focale;
- 13 IPMN avevano un cariotipo complesso, con più di 4 alterazioni ciascuno. Il numero medio di alterazioni nei casi complessi è stato 10 per ogni paziente. Dall'analisi è emerso che il numero di alterazioni è legato al grado di displasia suggerendo la presenza di differenze genetiche anche all'interno dei sottogruppi dell'IPMN a seconda del grado.

È stata inoltre effettuata l'analisi mutazionale, mediante sequenziamento Sanger, dei geni *KRAS*, *GNAS* e *TP53*. Nella nostra casistica 6 dei 13 pazienti con displasia severa presentavano mutazioni o delezioni di *TP53*, confermando che alterazioni di *TP53* sono presenti solo nei casi ad alto grado di displasia. Mutazioni di *GNAS* erano presenti in 2/20 casi, mentre mutazioni di *KRAS* erano presenti in 4/20 casi. Tuttavia, non è stata osservata alcuna correlazione tra queste ultime mutazioni e il grado di displasia.

L'attenzione si è poi focalizzata sull'analisi di *copy number* degli IPMN a cariotipo complesso. Tra le alterazioni identificate ricordiamo:

- il *gain* del cromosoma 12q in cui è localizzato il gene che codifica per MDM2, proteina che regola l'attività di p53. Questa alterazione è particolarmente interessante poiché è un dato che potrebbe andare ad implementare quello di *TP53*;
- il *gain* del cromosoma 8q24 che contiene il gene *MYC*;
- il *gain* del cromosoma 3q riscontrato nel 92% dei casi.

In particolare quasi tutti i casi (12/13) con displasia severa e cariotipo complesso hanno il *gain* del 3q. Questa regione è particolarmente interessante perché include oncogeni come *PIK3CA*, *GATA2* e *TERC* tutti legati alla deregolazione della crescita cellulare e alla progressione della malattia.

Il *gain* del cromosoma 3q è stato confermato sia mediante analisi FISH che Real time PCR. L'analisi FISH conferma la presenza di un aumento del numero di copie del cromosoma 3 in pazienti con IPMN con cariotipo complesso, sostenendo i dati ottenuti con gli array. Anche l'analisi di *copy number* mediante Real time PCR, eseguita utilizzando primers localizzati sul 3p, ha confermato l'amplificazione del cromosoma 3 in IPMN con cariotipo complesso rispetto a IPMN con cariotipo normale con un *p*-value di 0,008. Concentrandosi in maniera specifica sul gene *PIK3CA*, l'analisi di *copy number* mediante Real time PCR ha confermato l'aumento del numero di copie di questa regione genomica in IPMN con cariotipo complesso.

Inoltre è stata eseguita l'analisi di *gene expression* mediante Real time PCR dei geni *PIK3CA* e *TERC*. L'espressione di mRNA di *PIK3CA* e *TERC* è up-regolata in IPMN con *gain* di 3q rispetto a IPMN con cariotipo normale, quindi questi sembrerebbero essere tra i più importanti geni bersaglio del *gain* 3q. Questi dati sul *gain* e sulla over-espressione dei geni *PIK3CA* e *TERC* suggerisce che essi possano essere valutati come biomarcatori utili fin dai primi stadi per identificare pazienti con IPMN ad alto rischio.

Assegnista

Tutor

